

کیت اندازه گیری هورمون TSH در سرم انسان

TSH ELISA Kit

96 Tests: Cat. No: 0524-96

192 Tests: Cat. No: 2024-192

Rev: A2 (1402/04/17)

مقدمه:

TSH هورمونی گلیکوپروتئینی است که توسط سلول های تیروتروپ هیپوفیز قدامی ساخته و ترشح می شود و مسئول تنظیم ترشح هورمون های تیروکسین و ترییدوتیرونین توسط غده تیروئید است. تنظیم ترشح هورمون TSH از طریق هورمون آزادکننده تیروتروپین (TRH) صورت می پذیرد. TRH در هیپوتالاموس ساخته و به هیپوفیز قدامی منتقل می شود و باعث افزایش ترشح TSH می گردد. مقادیر هورمون های T3 و T4 در خون بر میزان ترشح هورمون TSH اثر دارند؛ به طوری که ترشح TSH توسط مقادیر T3 و T4 آزاد موجود در خون به صورت فیدبک منفی تنظیم می گردد. زنجیره آلفا در ساختار TSH و دیگر هورمون های گلیکوپروتئینی نظیر LH، FSH و hCG یکسان است؛ اما زنجیره بتا در هر پروتئین منحصر به فرد و مسئول فعالیت بیولوژیک و شاخص آنتی ژنیک آن هورمون می باشد. TSH یکی از مارکر تشخیص هایپر تیروئیدیسم یا هایپو تیروئیدیسم است. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری کمی غلظت TSH در سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این تست بر اساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. در این روش بی حرکت سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین استریتا ویدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی بادی مونوکلونال بیوتینیل ضد TSH صورت می گیرد. با مخلوط شدن آنتی بادی بیوتینیل، آنتی بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی ژن، واکنش بین آنتی بادی ها و آنتی ژن بدون هیچ رقابتی صورت می گیرد و کمپلکس ساندویچ محلول ایجاد می گردد. به موازات واکنش فوق، کمپلکس ایمنی به دلیل تمایل بسیار بالای بین استریتا ویدین و بیوتین، به سطح چاهک متصل می شود. پس از شستشوی چاهک ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ ایجاد شده و در نتیجه

شدت جذب نوری، با غلظت TSH سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت TSH سرم به کمک منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

۱۹۲ تستی	۹۶ تستی	محتویات کیت
دو عدد	یک عدد	میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استریتا ویدین تثبیت شده
یک سری ویال با غلظت های متفاوت	یک سری ویال با غلظت های متفاوت	کالیبراتورها (TSH Cal A-F) : شش ویال با غلظت های ۰.۰۰، ۰.۰۵، ۰.۱۰ و ۰.۲۵ IU/mL
دو ویال ۱۱ میلی لیتری	یک ویال ۱۱ میلی لیتری	محلول کونژوگه آنزیمی (TSH Enzyme Conjugate)
یک ویال ۲۰ میلی لیتری	یک ویال ۲۰ میلی لیتری	محلول شستشو (Wash Solution-50X)
دو ویال ۶/۵ میلی لیتری	یک ویال ۶/۵ میلی لیتری	محلول رنگزا A (Substrate Solution A)
دو ویال ۶/۵ میلی لیتری	یک ویال ۶/۵ میلی لیتری	محلول رنگزا B (Substrate Solution B)
یک ویال ۱۲ میلی لیتری	یک ویال ۱۲ میلی لیتری	محلول متوقف کننده (Stop Solution)
ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری	ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری	محلول کنترل (TSH Control)
دو ورق	یک ورق	برچسب مخصوص پلیت

توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در COA درج گردیده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

- دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- سمپلر کالیبره.
- آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

- محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نشود.

۳) توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBs Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های ایمنی انجام شود.

۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جلوگیری نمایید.

۶) نمونه بیماران، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

۱) برای این آزمایش از نمونه های سرم استفاده کنید. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا گردد. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.

۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

۳) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷

درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

۲) آماده سازی محلول رنگزا: محلول های رنگزا A و B را با حجم های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت، کنترل و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.

توجه: چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک ها یکسان می باشد.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی TSH به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویید.

علائم استفاده شده در پرچسب کالایا

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
REF	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

No.	Sample (μIU/mL)	Added (μIU/mL)	Exp. (μIU/mL)	Obs. (μIU/mL)	% Rec.
1	0.54	7.98	4.26	4.37	102.6
2	1.40	0.41	0.9	0.94	104.4
3	7.23	3.86	5.54	5.46	98.6

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت TSH در رت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (μIU/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	2.2	-1.8	1.3	-2.2	-1
2	5.8	2.4	-1.4	-0.9	-2.7
3	9.9	-2.4	2.2	-1.4	-2

۵) بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش با کمک اضافه کردن ترکیبات مندرج در جدول زیر به نمونه سرم، سنجش شد. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت غلظت ماده اضافه شده به غلظت TSH مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب ارزیابی شد. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $10 \pm 10\%$ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
hFSH	<0.0001	1000 ng/mL
hLH	<0.0001	1000 ng/mL
HCG	<0.0001	1000 ng/mL

۶) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با $0.1 \mu IU/mL$ تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

مقادیر مورد انتظار برای تست TSH به روش الایزا

شرکت تولید کننده کیت مقادیر مورد انتظار برای این تست را به فرار زیر مشخص کرده است. هرچند؛ این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه مصرف کننده تعیین گردد.

Normal Range For Adults

0.4 - 5 (μIU/mL)

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within-Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean TSH (μIU/mL)	0.95	5.2	9.6
SD (μIU/mL)	0.05	0.25	0.43
CV (%)	5.3	4.8	4.5

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between-Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean TSH (μIU/mL)	0.77	6.7	11.7
SD (μIU/mL)	0.05	0.41	0.69
CV (%)	6.5	6.1	5.9

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح TSH در ترکیب به‌دست آمده اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، $Bias < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۷) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۸) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (μIU/mL)
Cal. A	A1	0.011	0.013	0
	B1	0.014		
Cal. B	C1	0.058	0.06	0.5
	D1	0.062		
Cal. C	E1	0.343	0.349	2.5
	F1	0.354		
Cal. D	G1	0.644	0.633	5
	H1	0.621		
Cal. E	A2	1.191	1.177	10
	B2	1.163		
Cal. F	C2	2.591	2.552	25
	D2	2.513		

